

Rozprawa doktorska pt.

Poznanie funkcji biologicznej genu *HvGSK* jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)

Study of biological function of barley (*Hordeum vulgare* L.) *HvGSK* gene

Promotor prof. dr hab. Waław Orczyk. Promotor pomocniczy dr Marta Dmochowska-Boguta

Streszczenie

Brasinosteroidy (BR) są ważną grupą roślinnych regulatorów biorących udział w regulacji różnorodnych procesów wzrostu i rozwoju oraz procesów warunkujących tolerancję roślin na czynniki środowiskowe. BR poprzez ścieżkę sygnałową regulują ekspresję tysięcy genów. Głównymi efektorami ścieżki sygnałowej BR są dwa czynniki transkrypcyjne: BZR1 i BES1 (BZR2), które są negatywnie regulowane przez białko BIN2/GSK3, pierwszy raz opisane w ścieżce sygnałowej BR w *Arabidopsis thaliana*.

Kinaza syntazy glikogenu3 (GSK3) jest wysoce konserwatywną kinazą serynowo-treoninową, obecną we wszystkich eukariontach. W roślinach enzym ten, kodowany przez wielogenowe rodziny, jest kluczowym regulatorem szlaku sygnałowego zależnego od BR. Najważniejszą funkcją kinaz GSK jest fosforylacja i tym samym inaktywacja czynników transkrypcyjnych BZR1 i BES1. W konsekwencji blokuje to asocjację obydwu czynników transkrypcyjnych z DNA i negatywnie reguluje ekspresję genów zależnych od BR. Jęczmień jest bardzo ważną rośliną zbożową, czwartą po ryżu, pszenicy i kukurydzy pod względem areалу upraw, a jednocześnie jest gatunkiem modelowym zbóż klimatu umiarkowanego.

Celem pracy była weryfikacja hipotezy badawczej oraz uzyskanie odpowiedzi na związane z hipotezą pytanie: Czy tolerancja na zasolenie oraz wybrane cechy użytkowe jęczmienia są zależne od genu *HvGSK1.1* kodującego kinazę GSK3?

Hipoteza badawcza: Rośliny jęczmienia z wyciszoną ekspresją *HvGSK1.1* charakteryzują się wzmocnieniem ścieżki sygnałowej zależnej od BR oraz zmianami fenotypowymi takimi jak m.in. większa tolerancja na zasolenie, większa biomasa roślin i większe ziarniaki.

Oczekiwany zakres cech fenotypowych jęczmienia wynikał z danych literaturowych na temat genów biorących udział w transdukcji sygnałów zależnych od BR oraz zmian wywołanych egzogenną aplikacją tych hormonów. Gen *HvGSK1.1* był pierwszym genem z rodziny genów *GSK* w jęczmieniu zidentyfikowanym i sklonowanym w Zakładzie Inżynierii Genetycznej. Szczegółowa adnotacja tego genu jako *HvGSK1.1* została zaproponowana w publikacji (Groszyk, Yanushevska *i in.*, 2018). Gen ten wybrano do badań ze względu na jego duże podobieństwo do *OsGSK1* – genu ryżu, którego mutacja typu nokaut warunkowała podwyższoną tolerancję na stresi środowiskowe. Do realizacji celu posłużono się dwoma strategiami. W pierwszej charakteryzowano rośliny, w których posługując się technologią RNAi wyciszono ekspresję badanego genu. W drugiej strategii badany gen poddano edytowaniu metodą CRISPR/Cas9.

Materiałem badawczym było 11 linii transgenicznych jęczmienia wcześniej uzyskanych w zespole, z których 10 reprezentowało linie zawierające T-DNA z kasetą wyciszającą typu RNAi w pojedynczym locus w genomie jęczmienia. Rośliny te charakteryzowały się obecnością krótkich (22–25 nt) cząsteczek RNA (siRNA), komplementarnych do wyciszanego genu *HvGSK1.1* oraz obniżoną ekspresją tego genu w pokoleniu T₂.

W roślinach pokolenia T₄ obniżony poziom transkryptu *HvGSK1.1* obserwowano w 7 liniach natomiast w 3 liniach był on podobny do kontroli. Zamierzone, eksperymentalne wyciszenie *HvGSK1.1* powodowało zmiany ekspresji czterech paralogów *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* i *HvGSK4.1* wskazując na istnienie wzajemnie skorelowanej sieci regulacji obserwowanej w warunkach normalnych oraz w stresie zasolenia. We wszystkich 7 liniach z wyciszoną ekspresją *HvGSK1.1* zarówno w normalnych warunkach, jak i w stresie zasolenia biomasa 14 dniowych siewek była większa w porównaniu z nietransgeniczną kontrolą. Ta cecha była silnie ujemnie skorelowana z ekspresją *HvGSK1.1* i z wybranymi paralogami *GSK*. W liniach z silnym wyciszeniem obserwowano silną ujemną korelację ekspresji genu *HvGSK1.1* z masą nasion (MTZ). Wyniki biotestu Leaf Inclination wskazały, że zgodnie z założeniem wyciszenie *HvGSK1.1* wiązało się ze wzmocnieniem reakcji na BR co interpretowano jako wzmocnienie sygnalingu zależnego od BR.

W kolejnym etapie uzyskano mutanty *HvGSK1.1* będące efektem edytowania tego genu przy użyciu technologii CRISPR/Cas9. Analizy molekularne roślin pokolenia T₀ i T₁ potwierdziły integrację T-DNA z kasetą sgRNA/Cas9 oraz potwierdziły obecność mutacji genu docelowego. Sekwencjonowanie NGS edytowanego regionu genu *HvGSK1.1* w 20 roślinach pokolenia T₁ wykazało szeroką gamę mutacji oraz dużą różnorodność genotypów. Zgodnie z oczekiwaniem zdecydowana większość mutacji (zmiana ramki odczytu, przedwczesny kodon stop i terminacja translacji) była typu knock-out. Zidentyfikowano dwa mutanty (del 6 nt i zamiana nukleotydów TCGA na CTAC) w których oczekiwane zmiany (delecja dwóch aminokwasów kodowanej kinazy GSK3 i zamianę dwóch aminokwasów Glu113-Leu114 na Ala113-Thr114) nie wiązały się z wyłączeniem genu.

Zarówno mutanty typu knock-out jak i mutanty ze zmienioną sekwencją aminokwasów kinazy GSK3 będą materiałem biologicznym do identyfikacji mutacji off-target i szczegółowej fenotypowej charakterystyki mutantów, porównania obydwu grup roślin (po wyciszeniu i po edytowaniu) oraz porównania obydwu strategii. Badania te są zaplanowane w projekcie Preludium 17.

Study of biological function of barley (*Hordeum vulgare* L.) *HvGSK* gene

Abstract

Brassinosteroids (BRs) represent an important group of plant regulators involved in regulation of growth and development as well as plant tolerance to environmental factors. BRs regulate the expression of thousands of genes through a signal pathway. The main effectors of the BRs signaling pathway are two transcription factors: BZR1 and BES1 (BZR2), which are phosphorylated (and inactivated) by the GSK3 protein, first described in the BR signaling pathway and annotated as BIN2 in *Arabidopsis thaliana*. Glycogen synthase kinase3 (GSK3) is a highly conserved serine-threonine kinase present in all eukaryotes. In plants, this enzyme is encoded by a multigene family. It is a key regulator of the BR-dependent signaling pathway. The most important function of the GSKs is phosphorylation and thus inactivation of the transcription factors: BZR1 and BES1. The phosphorylation blocks the association of both TFs with DNA and negatively regulates the expression of BR-dependent genes. Barley is a very important cereal crop, the fourth after rice, wheat and maize in terms of cultivation acreage. It is also a model species of temperate climate cereals.

The aim of the study was to verify the research hypothesis and to obtain an answer to the question related to the hypothesis: Do the salinity tolerance and the selected functional characteristics of barley depend on the *HvGSK1.1* gene, which encodes GSK3 kinase?

Research hypothesis: Barley plants with silenced *HvGSK1.1* expression are characterized by enhanced BR-dependent signal transduction and show phenotypic changes including e.g., elevated tolerance to salinity, bigger plant biomass and larger kernels.

The range of barley traits expected in the *HvGSK1.1* silenced plants is based on the published results on genes involved in BR-dependent signal transduction and the changes caused by the exogenous application of the BRs. The *HvGSK1.1* gene was the first one from the *GSK* gene family in barley identified and cloned at the Department of Genetic Engineering. The detailed annotation of the gene was presented in the publication by Groszyk, Yanushevska *et al.*, (2018). The gene was selected for research due to its high similarity to the *OsGSK1* – a rice gene whose knockout mutation resulted in increased tolerance to environmental stresses.

Two strategies were used to achieve the goal. The first strategy involved detailed characterization of plants with silenced expression of *HvGSK1.1*, where RNAi technology was employed to silence the target. In the second strategy, the investigated *HvGSK1.1* gene was edited using the CRISPR / Cas9 method.

In the first strategy, the 11 transgenic barley lines previously obtained in the team, was used as the research material. 10 lines contained T-DNA and the RNAi silencing cassette in a single locus in the genome. These plants showed the presence of short (22– 25 nt) RNA molecules (siRNA), complementary to the silenced *HvGSK1.1* gene and the reduced expression of the target gene in the T₂ generation. In T₄ generation, the silencing of the *HvGSK1.1* was retained in 7 lines, while in 3 lines the expression of the target was similar to non-transgenic control. The experimental silencing of *HvGSK1.1* altered expression of four paralogs *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* and *HvGSK4.1* indicating the existence of a regulatory network observed under normal conditions and under salinity stress. In all 7 lines with suppressed *HvGSK1.1* expression, both under normal conditions and under salinity stress, the biomass of 14-day-old seedlings was higher compared to the non-transgenic control. This feature was strongly negatively correlated with the expression of *HvGSK1.1* and with expression of selected *GSK* paralogs. In the lines with strong silencing, a strong negative correlation was observed between the expression of the *HvGSK1.1* gene and the kernels weight (TKW). The results of the Leaf Inclination biotest indicated that, as assumed, the silencing of the *HvGSK1.1* was associated with enhanced BR response, which indicated an enhanced signaling of BR-dependent signal transduction pathway.

In the second strategy, the mutants of *HvGSK1.1* were generated by editing selected region of the gene by means of the CRISPR/Cas9 technology. Molecular analyzes of plants of the T₀ and T₁ generations confirmed the integration of T-DNA with the sgRNA/Cas9 cassette and confirmed the presence of the target gene mutation. Next Generation Sequencing (NGS) of the edited region of the *HvGSK1.1* in 20 plants (T₁) showed a wide variety of mutations and a large variety of genotypes. As expected, most of the changes (frame shift, premature stop codon, and translation termination) resulted in the knock-out of the target gene. The two changes, namely deletion of 6 nt and TCGA to CTAC nucleotide conversion represented mutants with expected changes of amino acid composition of *HvGSK1.1*. Both types of mutants (knock-out and altered *GSK3* amino acid sequence) will be used for analysis of off-target changes and detailed phenotypic characterization. The analysis of both groups of plants (RNAi-based silencing and gene editing) will allow for a directed comparison of the two strategies.

(-) mgr Yuliya Kloc